



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/41253 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. November 1997 (06.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02179 (22) Internationales Anmeldedatum: 26. April 1997 (26.04.97)		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BA, BB, BG, BR, CA, CN, CU, CZ, DE, EE, GE, HU, IL, IS, JP, KP, KR, LC, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: 196 16 750.7 26. April 1996 (26.04.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MIRA DIAGNOSTICA GMBH (DE/DE); Hemmelrather Weg 201, D-51377 Leverkusen (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEISER, Robert-Matthias (DE/DE); Dunkelberger Strasse 30, D-42697 Solingen (DE). SPERVESLAGE, Jens (DE/DE); Liebfrauenstrasse 28, D-40591 Düsseldorf (DE).		(74) Anwälte: MEYERS, Hans-Wilhelm usw.; Postfach 10 22 41, D-50462 Köln (DE).	

(54) Title: PROCESS FOR DETECTING MICRO-ORGANISMS IN MIXTURES BY MODULAR PCR

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON MIKROORGANISMEN IN GEMISCHEN DURCH MODULARE PCR

(57) Abstract

A process is disclosed for detecting and identifying micro-organisms in a mixed sample without having to separate the germs, for example by passing them into individual colonies, in order to identify them. This process uses molecular biology techniques. By hybridising with probes which can recognise differently preserved sections of the genetic information of the micro-organisms of interest, detection and differentiation of the micro-organisms in the mixture is achieved. For this purpose, a general germ determination based on highly preserved sequence sections is combined with an individually defined specification based on less well preserved sequence sections. To ensure a sufficiently sensitive detection, an amplification of the nucleic acid section, for example by PCR, is preferably carried out.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Verfahren, das den Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung der Keime z.B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. In diesem Verfahren werden molekularbiologische Techniken angewendet. Durch Hybridisierung mit Sonden, die unterschiedlich konservierte Abschnitte der Erbinformation der betreffenden Mikroorganismen erkennen können, wird die Detektion und Differenzierung der Mikroorganismen im Gemisch erreicht. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierter Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen. Vorzugsweise wird für hinreichende Sensitivität des Nachweises eine Amplifikation des Nucleinsäureabschnitts, z.B. mittels PCR, durchgeführt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NB	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen
in Gemischen durch modulare PCR

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehreren Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen sowie eine Zusammenstellung von Komponenten zur Durchführung des Verfahrens. Das erfindungsgemäße Verfahren wird als modulare Polymerasekettenreaktion (PCR) bezeichnet.

Die Identifikation von Mikroorganismen aus komplexen Proben (die mehrere unterschiedliche Keime im Gemisch enthalten) ist eine wichtige und schwierige Aufgabe z. B. bei Hygieneuntersuchungen und anderen Vorhaben.

Stand der Technik ist hier die Kultivierung der Mikroorganismen, ihre Selektivanreicherung auf speziellen Nährmedien, die Einzelkoloniepassage und schließlich die taxonomische Identifikation unter Analyse verschiedener phänotypischer Parameter (Gram-Färbung, Begeißelung, stoffwechsel-physiologische Leistungen etc.). Besondere Anerkennung und Bedeutung hat die Fettsäureanalyse gewonnen. Die typischen Profile der gaschromatographischen Trennung der Fettsäuren der Mikroorganismen gestatten in der Regel eine Art- oder sogar Pathovarietäten- und Serotypen-Identifikation. Der hierfür nötige apparative Aufwand ist allerdings sehr hoch und nur für große Laboratorien realisierbar.

- 2 -

Außerdem verlangt die notwendige Reinanzucht der Einzelkolonien einen erheblichen Zeit- und Materialaufwand.

Daneben gibt es Systeme, die eine ähnlich genaue Differenzierung und Identifikation von Mikroorganismen auf der Basis von Stoffwechselleistungen der Zellen versprechen. Abgesehen von häufigen Fehlinterpretationen ist dieses Verfahren wiederum mit dem schwerwiegenden Nachteil belastet, daß es nur an Reinkulturen zu verwertbaren Aussagen führt. Dies ist jedoch, wie erwähnt, eine aufwendige, langwierige und kostenintensive Aufgabe.

Ein weiterer Nachteil bekannter Identifikationssysteme besteht darin, daß bei der Untersuchung komplexer Proben eine Vielzahl von Mikroorganismen unerkannt bleibt, weil ihre Kulturansprüche unbekannt sind.

Die Aufklärung von konservierten Sequenzabschnitten im Bereich der ribosomalen Gene bei Prokaryonten und ihre Nutzung für molekularbiologische Nachweistechniken (Hybridisierung bzw. Amplifikationsmethoden wie PCR) hat in den letzten fünf Jahren phylogenetische Zusammenhänge aufdecken können, die die Bakterientaxonomie entscheidend vorangebracht haben. Der Wert dieser Methode für diagnostische Aufgabenstellungen in der Bakteriologie ist heute bereits unbestritten.

Genutzt wird diese Technik gegenwärtig einerseits für taxonomische Fragestellungen. Hierbei werden vorrangig nach Amplifikation, unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen, die entstandenen Amplicons kloniert, sequenziert und ihre Homologie zu bekannten Sequenzen für die taxonomische Identifikation bzw. Einordnung eingeschätzt.

Andererseits werden auf der Basis derart gewonnener Sequenzinformationen Primer für diagnostische Aufgabenstellungen entworfen, um interessierende Organismen direkt nachweisen

zu können. Es existieren mittlerweile vielfältige Protokolle für den Nachweis der unterschiedlichsten Mikroorganismen-Arten und Subtypen.

Der Nachteil dieses Standes der Technik besteht darin, daß entweder für jede diagnostische Aufgabenstellung eine individuelle Analyse oder aber bei der Charakterisierung von komplexen Gemischen aufwendige Einzelkoloniepassagen oder Genklonierungen durchgeführt werden müssen.

Unter Nutzung hochkonservierter Primersequenzen werden in komplexen Proben durch alternative Verfahren Teile der Erbinformation der vorhandenen Mikroorganismen amplifiziert und die Einschätzung der Probenkomplexität sowie die taxonomische Identifikation ihrer Bestandteile durch anschließende Analyse von Restriktionslängen-Polymorphismen vorgenommen. Dieser Auswertemodus ist als sehr aufwendig und wenig routinegeeignet einzuschätzen.

Eine molekularbiologische Methode zur Genomanalyse ist unter der Bezeichnung HLA-Typing bekannt. Hierbei wird der allele Zustand, nach Amplifikation des betreffenden Locus, durch Hybridisierung mit Sonden ausgewählter Spezifität charakterisiert.

Das der Erfindung zugrundeliegende technische Problem besteht darin, ein Verfahren bereitzustellen, das eine sichere Bestimmung etwaiger in einer Probe befindlicher Mikroorganismen zuläßt, selbst wenn diese in einer Mischung mit Mikroorganismen verschiedenster Art vorliegen. Dabei soll das Verfahren neben hoher Sicherheit in der Bestimmung der Mikroorganismen auch einfach und kostengünstig durchzuführen sein.

Dieses Problem wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst.

Das HLA-Typing unterscheidet sich vom erfindungsgemäßen Verfahren z. B. dadurch, daß ersteres eukaryontische Gensequenzen und die Analyse der Gensequenz eines individuellen Organismus betrifft. Das erfindungsgemäße Verfahren ist im Unterschied zum HLA-Typing zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehrerer Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, geeignet. Dabei werden molekularbiologische Techniken, wie Amplifikationsreaktionen eingesetzt. Erfindungsgemäß werden mindestens eine Hybridisierungssonde (A), die konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus (men) anzuzeigen in der Lage ist und mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierte Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus (men) anzuzeigen in der Lage ist, zu der Probe gegeben mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß und die Probe sich in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet. Durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster erfolgt eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist durch seinen modularen Aufbau vorteilhaft. Dabei wird eine allgemeine PCR-Reaktion, die für umfangreiche Gruppen von Mikroorganismen identisch ist mit einer nachfolgenden Detektion, durch Nutzung taxon-spezifischer Sequenzen innerhalb der amplifizierten DNA, verknüpft. Durch die Verwendung von Hybridisierungssonden, die mikrobiellen Nucleinsäuresequenzen unterschiedlichen Konservierungsgrades entsprechen, wird der Nachweis und die Identifikation von Mikroorganismen ermöglicht, die sich in einer Mischprobe befinden, ohne daß für die Identifikation eine Trennung z. B. durch Einzelkolonie-Passagen notwendig ist. Hierbei wird eine Kombination aus allgemeiner Keimbestimmung auf Basis hochkonservierter Sequenzabschnitte und individuell definierbarer Spezifizierung durch weniger konservierte Sequenzabschnitte vorgenommen.

Vorzugsweise werden zur Gewährleistung einer ausreichenden Sensitivität des Tests, unter Nutzung der Hybridisierungssonden als Startermoleküle, Teile der Erbinformation in vitro amplifiziert (z.B. durch PCR).

Erfindungsgemäß werden vorzugsweise die Hybridisierungssonde(n) A als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion genutzt. Es ist aber ebenfalls möglich, die Hybridisierungssonde(n) B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) A zur Detektion, die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B zur Detektion oder die Hybridisierungssonde(n) A und B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) A zur Detektion zu nutzen.

Diese Starter-Hybridisierungssonden (Primer) entsprechen entweder denjenigen hohen Konservierungsgrades oder aber denjenigen hoher Spezifität, während für die Detektion Hybridisierungssonden des jeweils entgegengesetzten Konservierungsgrades verwendet werden.

Der Vorteil dieser Ausführungsform besteht darin, daß auf diese Weise die gewünschte Verknüpfung von Amplifikation und Detektion mit den Hybridisierungssonden engerer und breiterer Spezifität realisiert wird.

Vorteilhafterweise erfolgt ein Teil des Verfahrens an einer festen Phase durch Bindung eines Teils der Hybridisierungssonden, wobei die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt oder daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft. Dies hat den Vorteil, daß auf einfache Weise die gebildeten Komplexe aus Amplifikat und Detektions-

sonde von sonstigen Komponenten vorangegangener Reaktionen-
stufen getrennt werden können.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäß Verfahrens befindet oder befinden sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen) oder die konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet oder befinden sich zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen). Vorteilhaft ist dies, weil eine zusätzliche Selektion der sequenzrichtigen Amplifikation erreicht wird.

Insbesondere kann erfindungsgemäß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt werden. Dieses bietet den Vorteil, in einer Reaktion auch solche Mikroorganismen gleichzeitig zu amplifizieren, für die keine hinreichend übereinstimmenden Hybridisierungssonden als Starter existieren.

Es ist erfindungsgemäß ebenfalls möglich, die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden durchzuführen, um vorteilhafte Weise, entsprechend der analytischen Aufgabenstellung, Gruppen von Mikroorganismen detektieren zu können, ohne daß entsprechende Hybridisierungssonden dieser Gruppenspezifität zur Verfügung stehen müssen.

Ribosomale Gensequenzen haben sich als besonders geeignet erwiesen, im erfindungsgemäß Verfahren eingesetzt zu werden. Ribosomale Gensequenzen bieten den Vorteil, daß sie hochkonservierte und weniger konservierte Abschnitte in der hier interessierenden bevorzugten engen Nachbarschaft aufweisen. Ein weiterer Vorteil der Verwendung dieser Gensequenzen besteht darin, daß ribosomale Gene in mehreren Kopien je Genom von Mikroorganismen existieren, was zu einer

vergleichsweise höheren Sensitivität des erfindungsgemäßen Assays beiträgt.

Die Figur 1 veranschaulicht in schematischer Darstellung die oben beschriebenen Zusammenhänge. Die mit hochkonservativen Bereichen einer Genstruktur von rDNA hybridisierenden Sonden A1 und A2 hybridisieren mit zwei verschiedenen Bereichen einer für 16S rRNA kodierenden DNA-Struktur eines Prokaryonten. Diese Bereiche flankieren eine Region, in der sich mittel und niedrig konservierte Bereiche befinden, die ihrerseits mit den Hybridierungssonden B1 und B2 in hybridisierende Wechselwirkung treten. Die Amplifikation ergibt eine detektierbare Menge an analysierbarer Substanz, die bei positiver Reaktion eine Unterscheidung von Familien und/oder Arten von Mikroorganismen ermöglicht.

Durch Temperatur, Ionenstärke und andere, insbesondere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren, können die Hybridisierungsbedingungen jeweils so stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridierungssonden gewährleistet wird. Wie die Stringenz im einzelnen zu wählen und einzustellen ist, kann der Fachmann mit ihm bekannten Mitteln festlegen (vergl. U. Wobus, "Isolierung, Fraktionierung und Hybridisierung von Nucleinsäuren", Akademie-Verlag, Berlin, 1981, 229 Seiten).

Die Auswahl der Hybridisierungssonden erfolgt in Abhängigkeit von der analytischen Aufgabenstellung. Es sind sowohl allgemeine Keimzahlbestimmungen in Kombination mit der Detektion spezieller Arten als auch die Analyse und Charakterisierung sehr komplex zusammengesetzter Proben möglich.

Der Anwender kann mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens in Abhängigkeit von der analytischen Aufgabenstellung die Analyse so durchführen, daß er Reaktionsgefäße, die unter-

schiedliche, vorzugsweise an fester Phase gebundene Hybridisierungssonden enthalten, in modularer Weise so zusammenfügt, daß eine Vielzahl von Proben oder verschiedene analytische Fragestellungen an einer oder wenigen Proben parallel und gleichzeitig untersucht werden.

Erfnungsgemäß wird bevorzugt eine Zusammenstellung eingesetzt, die Komponenten zur Durchführung des erfundungsgemäßen Verfahrens enthält. Dazu gehören neben anderen Bestandteilen die Hybridisierungssonde(n) A und B. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfundungsgemäßen Zusammenstellung enthält ein Kit mindestens eine Hybridisierungssonde A und/oder B gekoppelt an einen Träger, z. B. ein Reaktionsgefäß. Diese Reaktionsgefäße können als Module für jeweils ähnlich gelagerte Analysenprobleme verwendet werden.

Die erfundungsgemäße Zusammenstellung enthält vorzugsweise auch Reagenzien für die Durchführung von Amplifikationsreaktionen und/oder Komponenten für die Detektion von Amplifikaten. Dazu gehören Reaktionspuffer, dNTP-Mix, Wasser, Enzyme, Methodenbeschreibungen, Gebrauchsanweisungen, Warnhinweise und ähnliches.

Die Erfindung wird an den folgenden Beispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Das Vorgehen gliederte sich in folgende Etappen:

1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden
2. Probenvorbereitung
3. PCR-Amplifikation
4. Detektion

1. Auswahl der Sequenzen für die Sonden

- 9 -

Hybridisierungssonden A:

Die Hybridisierungssonden A mit Breitband-Spezifität dienten zur Amplifikation aller in der Untersuchungsprobe vorhandenen Bakterien und entsprachen einem hochkonservierten Abschnitt der ribosomalen 16S rDNA nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New Bacterial Systematics, p 151-193, 1993):

16S-rDNA Primer zur Amplifikation

10-30f:	GAG TTT GAT CCT GGC TCA G	Seq. ID # 1
530r:	GTA TTA CCG CGG CTG CTG	Seq. ID # 2

Hybridisierungssonden B:

Die Hybridisierungssonden B mit engerer Spezifität dienten als Detektionssonden.

Zur Auswahl der geeigneten Detektionssonden wurden Datenbankrecherchen durchgeführt. Auf diese Weise konnte unter anderem gezeigt werden, daß die ausgewählten Sonden spezifisch für den jeweiligen Organismus sind. Dabei ergaben sich folgende Sequenzen:

Escherichia coli: AAC GUC GCA AGA CCA AAG Seq. ID # 3
Bacillus subtilis: GGT TGT TTG AAC CGC ATG GTT Seq. ID # 4

Die Sonden wurden zur Detektion mittels ELISA-Reader am 5'-Ende biotinyliert. Dadurch konnte nach Zugabe einer Streptavidin-konjugierten Peroxidase ein Farbumschlag detektiert werden (Soumet et al., BioTechniques 19: 792 - 796 (1995)).

Beide Sonden wurden in 5 getrennten Versuchen auf ihre Spezifität hin überprüft, indem jeder Organismus mit den eigenen sowie den für den anderen Organismus spezifischen Sonden kontrolliert wurde.

- 10 -

Außerdem wurden die Sonden an vier weiteren Mikroorganismen getestet. Dabei ergaben sich keine Kreuzreaktionen.

2. Probenvorbereitung

Zunächst wurden in gepuffertem Peptonwasser die Keime angezüchtet und anschließend aus dieser Gemischprobe die DNA aller Organismen mittels eines DNA-Isolierungskits isoliert.

3. PCR-Amplifikation

Für die PCR-Amplifikation wurde ein Primer (530r, s.o.) nach Anweisung der Firma Nunc kovalent an die Kavität der CovaLink™-Platte gebunden.

Dazu wurde in jede Kavität ein Gemisch aus 100 ng des zuvor am 5'-Ende phosphorylierten 530r-Primers, gelöst in 75 µl 13 mM 1-Methyl-imidazol, gegeben. Hinzugefügt wurden 25 µl frisch angesetzte 40 mM 1-Ethyl-3-(3-di-methylaminopropyl-carbodiimide (EDC)). Die Platte wurde dann bei 50°C für 5 Stunden inkubiert und dreimal bei 50°C mit 0,4 N NaOH, 0,25% Tween 20 gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit der Waschlösung, woran sich weitere drei Waschungen anschlossen. Als letzte Waschlösung wurde deionisiertes Wasser eingesetzt.

Zur Amplifizierung der 16S-rDNA wurde die Methode nach Stackebrandt und Liesack (Handbook of New Bacterial Systematics, p 151-193, 1993) leicht modifiziert. Folgende PCR-Bedingungen wurden in der PCR eingesetzt (Tab. 1):

Tabelle 1

Reaktionskomponenten:	Reaktionsansatz:	Cyclerbedingungen:
10x Reaktionspuffer: 2M Tris 100 mM MgCl ₂ 1M (NH ₄) ₂ SO ₄ 1% Tween dNTP-Mix: jeweils 1M Steriles Wasser	5 µl Reaktionspuffer 10 µl dNTP 0,5 µM Primer 10-30f 0,06 µM Primer 530r 5 µl DNA 2,5 U Tag add 50 µl steriles Wasser	94°C 3 min. 1 Zyklus 93°C 1 min 55°C 1 min 74°C 1 min 28 Zyklen 74°C 10 min 4°C hold 1 Zyklus

4. Detektion

Nach Beendigung der PCR wurde nach dem Protokoll der Firma Nunc weiterverfahren und die Hybridisierung der Detektionssonden durchgeführt.

Nach der Amplifikation wurden die Kavitäten trockengesaugt und zweifach mit 0,2 M NaOH, jeweils mit 5-minütiger Inkubation, gewaschen. Anschließend wurde zweifach mit Hybridisierungslösung (6x standard saline citrate [SSC], 5x Denhardt's Lösung, 100 µg/ml gescherter und denaturierter Heringssperma-DNA) gewaschen. Für die Hybridisierung wurden die biotinylierten Hybridisierungssonden auf eine Konzentration von 0,1 nmol/L in Hybridisierungslösung eingestellt und in 100 µl-Aliquots in die Kavitäten gefüllt. Die Hybridisierungsreaktion lief bei 37°C für 3h. Danach wurden drei Waschschritte bei 37°C durchgeführt. Das erste Mal mit 2x SSC, 0,1% Tween 20 für 20 Minuten. Die beiden anderen Male mit 0,1x SSC, 0,1% Tween 20 für jeweils 20 Minuten.

Anschließend wurde die Strepavidin konjugierte Peroxidase dazugegeben. Die Peroxidase (Sigma Chemica, St. Louis. MO, USA) wurde in SPO-Lösung (100 mM Tris-HCL, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,05% Tween 20) 1 : 1000 verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung wurden in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit SPO-Lösung gewaschen.

- 12 -

Als Substrat wurden 100 μ l TMB-Lösung (1,5 mg/ml Tetramethylbenzidine; Sigma Chemica) in 25 mM Citronensäure, 50 mM Na₂PO₄, 0,03% H₂O₂, 10% Dimethyl Sulfoxid [DMSO], pH 5,0) gelöst und dazugegeben. Nach 45 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion mit 25 μ l 2M H₂SO₄ gestoppt und bei 450 nm am ELISA-Reader gemessen.

Die zu beobachtenden Farbveränderungen in den einzelnen Kavitätaten waren der Indikator für das Vorhandensein derjenigen Bakterienart in der Untersuchungsprobe, der die zugesetzte Detektionssonde entsprach.

Es konnte so gezeigt werden, daß sich aus einem Gemisch von verschiedenen Mikroorganismen ohne Herstellung einer Reinkultur individuelle Arten eindeutig nachweisen lassen.

Beispiel 2

Es wird analog nach Beispiel 1 verfahren. Wasserproben und Aufschwemmungen von industriellen Magermilchpulvern werden auf die Anwesenheit von *Staphylococcus* ssp., *Salmonella* ssp. und *Escherichia* ssp. untersucht.

Dazu wurden Oligonucleotide mit folgender Sequenz als Hybridisierungssonden A mit Breitbandspezifität gewählt:

16SA1: 5 - TAC GGG AGG CAG CAG - 3	Seq. ID # 5
16SA2: 5 - TAC CAG GGT ATC TAA TCC - 3	Seq. ID # 6

Bei Verwendung dieser Oligonucleotide als Startermoleküle für die PCR-Amplifikation werden bei den analysierten Prokaryonten Amplifikate mit einer Länge von etwa 460 bp gewonnen.

Das Oligonucleotid 16SA2 wurde für die Koppelung an die CovaLink™-Platte ausgewählt und wurde im Reaktionsansatz in einer Konzentration von 0,06 μ M benutzt, während das Oligonucleotid 16SA1 im Reaktionsansatz mit einer Konzentration von 0,5 μ M verwendet wurde.

- 13 -

Als Hybridisierungssonden B mit engerer Spezifität für die Detektion dienten folgende Oligonucleotide:

Staphylococcus: 5 - TGT GCA CAT CTT GAC GGT - 3 Seq. ID # 7

Salmonella: 5 - CTG GCA GGC TTG AGT CTT - 3 Seq. ID # 8

Escherichia: 5 - CTC ATT GAC GTT ACC CGC - 3 Seq. ID # 9

Die Versuchsbedingungen waren mit denen von Beispiel 1 identisch, außer der Hybridisierungs- und Waschtemperaturen bei der Detektion. Hier wurde bei 52°C sowohl hybridisiert als auch gewaschen. Den Proben wurden hierfür die Bakterien sowohl einzeln als auch im Gemisch in unterschiedlichen Konzentrationen und Konzentrationsverhältnissen (10^3 oder 10^6 Keimen/ml) zugesetzt. Die nachfolgende Tabelle 2 faßt die Ansätze sowie Ergebnisse in semiquantitativer Form zusammen.

Tabelle 2

Proben Nr.	Konzentration Keime/ml			Detektion (semiquantitativ)		
	S. aur.	S. typh.	E. coli	S. aur.	S. typh.	E. coli
1	0	10^3	10^6	-	++	+++
2	0	10^6	10^3	-	+++	+
3	0	10^6	10^6	-	+++	+++
4	0	10^3	10^3	-	++	++
5	10^3	0	10^6	+	-	+++
6	10^6	0	10^3	+++	-	+
7	10^6	0	10^6	+++	-	++
8	10^3	0	10^3	+	-	+
9	10^3	10^6	0	+	+++	-
10	10^6	10^6	0	+++	+++	-
11	10^3	10^3	0	+	+	-
12	10^6	10^3	0	+++	++	-
13	10^3	10^3	10^3	++	+	+
14	10^6	10^6	10^6	+++	+++	+++

- 14 -

Es zeigte sich, daß die Wahl der Hybridisierungstemperatur beim Detektionsschritt für die Differenzierung zwischen *Salmonella* und *Escherichia* kritisch ist. Nach entsprechender Wahl der Hybridisierungsbedingungen ist der spezifische Nachweis von *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* in aussagekräftiger Weise möglich.

- 15 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: NewLab Diagnostic Systems GmbH
- (B) STRASSE: Max-Planck-Str. 15A
- (C) ORT: Erkrath
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 40699

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zum Nachweis von Mikroorganismen in Gemischen durch modulare PCR

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

(iv) COMPUTER-LESBARE FÄSSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 19 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAGTTTGATC CTGGCTCAG

19

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GTATTACCGC GGCTGCTG

18

- 16 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AACGUCGCAA GACCAAAG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGTTGTTTGA ACCGCATGGT T

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: nicht bekannt
 - (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TACGGGAGGC AGCAG

15

- 17 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TACCAAGGGTA TCTAATCC

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

TGTGCACATC TTGACGGT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

CTGGCAGGCT TGAGTCTT

18

- 18 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: nicht bekannt
- (D) TOPOLOGIE: nicht bekannt

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CTCATTGACG TTACCCGC

18

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von einem Mikroorganismus oder mehreren Mikroorganismen in einer Probe, die eine Vielzahl von verschiedenen Mikroorganismen enthält, mittels molekularbiologischer Techniken, wie Amplifikationsreaktionen,

wobei

mindestens eine Hybridisierungssonde (A) die konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus (men) anzuzeigen in der Lage ist und

mindestens eine Hybridisierungssonde (B), die weniger konservierten Nucleinsäuresequenzen in dem oder den interessierenden Mikroorganismus (men) anzuzeigen in der Lage ist,

zu der Probe gegeben werden mit der Maßgabe, daß pro interessierendem Mikroorganismus mindestens eine Hybridisierungssonde des Typs (A) und des Typs (B) vorhanden sein muß, sich die Probe in einem hybridisierungsfähigen Zustand befindet und durch ein entstehendes Hybridisierungsmuster eine Identifikation des oder der interessierenden Mikroorganismen erfolgt.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für ausreichende Sensitivität Teile der Erbinformation *in vitro* amplifiziert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonde(n) A und/oder B als Starter für die Amplifikation und die Hybridisierungssonde(n) B oder A zur Detektion genutzt werden.

- 20 -

4. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die weniger konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), zwischen den konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), befindet.
5. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß sich die konservierte(n) Sequenz(en), die der (den) Hybridisierungssonde(n) A entspricht (entsprechen), zwischen den weniger konservierten Sequenzbereichen, die der (den) Hybridisierungssonde(n) B entspricht (entsprechen), befindet.
6. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Hybridisierungssonden an einer festen Phase gekoppelt ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase nach der Amplifikation erfolgt.
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplung der entsprechenden Hybridisierungssonde(n) an die feste Phase vor der Amplifikation erfolgt und die Amplifikation zumindest teilweise an der festen Phase verläuft.
9. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation simultan mit mehreren Starterpaaren auf gleichzeitig mehreren Targetsequenzen durchgeführt wird.
10. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektion simultan mit mehreren verschiedenen Sonden erfolgt.

11. Verfahren gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungssonden Teile von ribosomalen Gensequenzen sind.
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierungsbedingungen durch Temperatur, Ionenstärke und andere die Wasserstoffbrückenbildung beeinflussende Faktoren jeweils so stringent gewählt werden, daß die für die Aussage des Verfahrens erforderliche Spezifität der Hybridisierungsreaktion(en) zwischen Targetsequenz und den Hybridisierungssonden gewährleistet wird.
13. Zusammenstellung enthaltend Komponenten zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
14. Zusammenstellung gemäß Anspruch 13, enthaltend Hybridisierungssonde(n) A und B.
15. Zusammenstellung gemäß Anspruch 13 und/oder 14, wobei mindestens eine Hybridisierungssonde A und/oder B an einen Träger, wie ein Reaktionsgefäß, gekoppelt ist.
16. Zusammenstellung gemäß mindestens einem der Ansprüche 13 bis 15, enthaltend Reagenzien für die Durchführung von Amplifikationsreaktionen und/oder Komponenten für die Detektion von Amplifikaten.

1 / 1

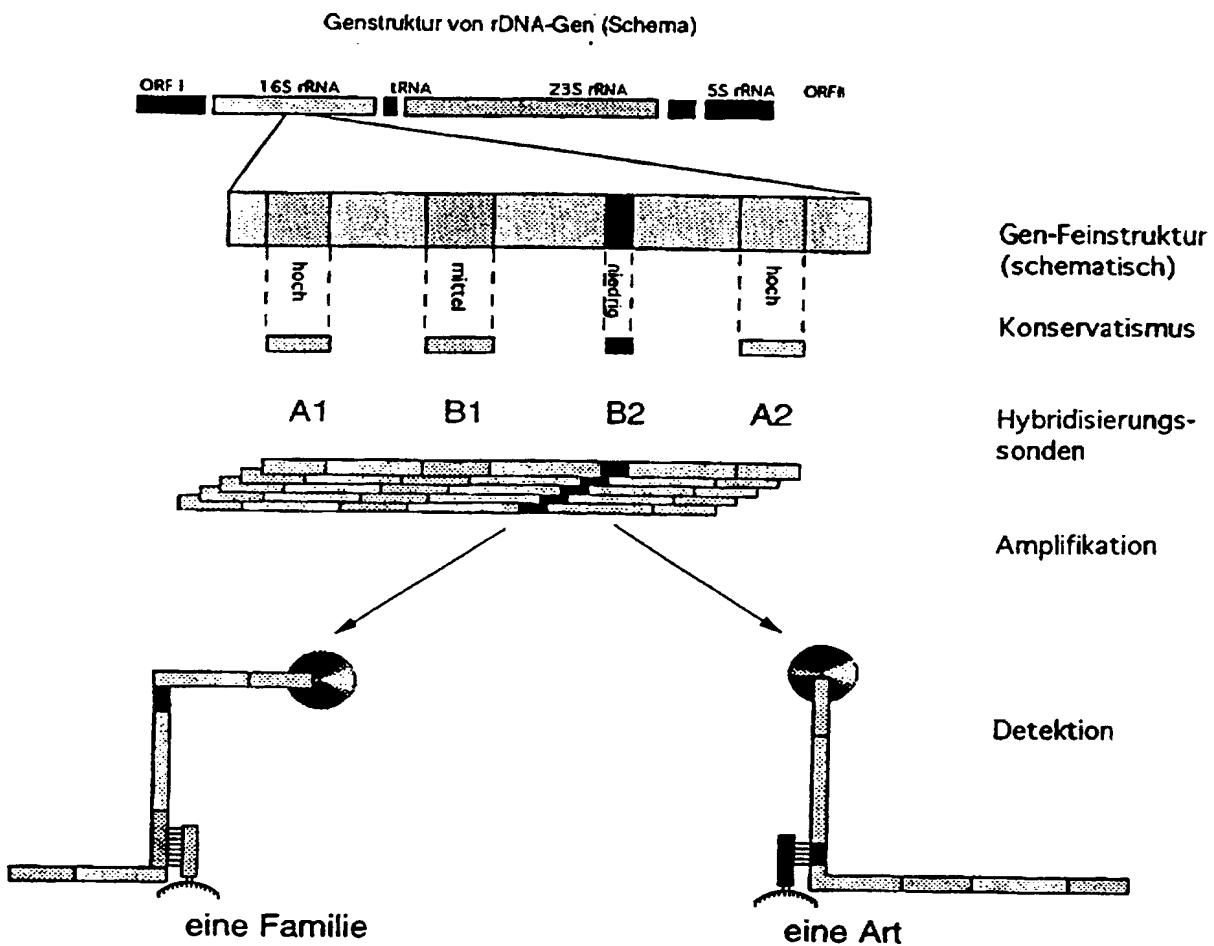


Fig. 1:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/02179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, pages 143-149, XP000612834 EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" see the whole document ---	1-16
X	US 5 494 795 A (GUERRY PATRICIA ET AL) 27 February 1996 see the whole document ---	1-5, 12-14, 16
X	EP 0 528 306 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 February 1993 see the whole document ---	1-5, 9-14, 16
Y	---	6-8, 15
	---	-/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 August 1997

Date of mailing of the international search report

12.09.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patendaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 97/02179

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 90 11369 A (HOLMES MICHAEL JOHN ;CEMU BIOTEKNIK (SE)) 4 October 1990 see claims ---	6-8,15
X	PCR METHODS & APPLICATIONS, vol. 1, 1991, pages 51-56, XP000609831 BARRY T ET AL: "THE 16S/23S RIBOSOMAL SPACER REGION AS A TARGET FOR DNA PROBES TO IDENTIFY EUBACTERIA" see the whole document ---	1-5,9-16
A	BIO/TECHNOLOGY, vol. 8, no. 3, 1 March 1990, pages 233-236, XP000244289 BARRY T ET AL: "A GENERAL METHOD TO GENERATE DNA PROBES FOR MICROORGANISMS" see the whole document -----	1-16

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 97/02179

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5494795 A	27-02-96	NONE		
EP 0528306 A	24-02-93	US 5422242 A	06-06-95	
		AU 659657 B	25-05-95	
		AU 2096192 A	08-04-93	
		CA 2075847 A	16-02-93	
		CN 1071955 A	12-05-93	
		IL 102765 A	18-03-97	
		JP 6261757 A	20-09-94	
		KR 9508574 B	03-08-95	
		NZ 243921 A	26-01-94	
WO 9011369 A	04-10-90	AT 147791 T	15-02-97	
		AU 646220 B	17-02-94	
		AU 5272890 A	22-10-90	
		CA 2050681 A	23-09-90	
		DE 69029726 D	27-02-97	
		EP 0464067 A	08-01-92	
		JP 4505999 T	22-10-92	
		US 5629158 A	13-05-97	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen
PCT/EP 97/02179

A. Klassifizierung des Anmeldungsgegenstandes IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, 1994, Seiten 143-149, XP000612834 EHRMANN M ET AL: "REVERSE DOT BLOT HYBRIDIZATION: A USEFUL METHOD FOR THE DIRECT IDENTIFICATION OF LACTIC ACID BACTERIA IN FERMENTED FOOD" siehe das ganze Dokument ---	1-16
X	US 5 494 795 A (GUERRY PATRICIA ET AL) 27. Februar 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-5, 12-14, 16
X	EP 0 528 306 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24. Februar 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-5, 9-14, 16
Y	---	6-8, 15
	---	-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zwieschafft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

1

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 28. August 1997	Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts 12.08.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Müller, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Patentzeichen
PCT/EP 97/02179

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 90 11369 A (HOLMES MICHAEL JOHN ;CEMU BIOTEKNIK (SE)) 4.Okttober 1990 siehe Ansprüche ---	6-8,15
X	PCR METHODS & APPLICATIONS, Bd. 1, 1991, Seiten 51-56, XP000609831 BARRY T ET AL: "THE 16S/23S RIBOSOMAL SPACER REGION AS A TARGET FOR DNA PROBES TO IDENTIFY EUBACTERIA" siehe das ganze Dokument ---	1-5,9-16
A	BIO/TECHNOLOGY, Bd. 8, Nr. 3, 1.März 1990, Seiten 233-236, XP000244289 BARRY T ET AL: "A GENERAL METHOD TO GENERATE DNA PROBES FOR MICROORGANISMS" siehe das ganze Dokument -----	1-16

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. als Aktenzeichen
PCT/EP 97/02179

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er)s der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 5494795 A	27-02-96	KEINE		
EP 0528306 A	24-02-93	US 5422242 A		06-06-95
		AU 659657 B		25-05-95
		AU 2096192 A		08-04-93
		CA 2075847 A		16-02-93
		CN 1071955 A		12-05-93
		IL 102765 A		18-03-97
		JP 6261757 A		20-09-94
		KR 9508574 B		03-08-95
		NZ 243921 A		26-01-94
WO 9011369 A	04-10-90	AT 147791 T		15-02-97
		AU 646220 B		17-02-94
		AU 5272890 A		22-10-90
		CA 2050681 A		23-09-90
		DE 69029726 D		27-02-97
		EP 0464067 A		08-01-92
		JP 4505999 T		22-10-92
		US 5629158 A		13-05-97

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)